

Análisis de las pruebas de laboratorio que miden trastornos de la coagulación

I. Bioquímica de la coagulación

DR. ALBERTO BARRANTES B. *

DR. CARLOS MONTERO U. **

DR. ROBERTO CORDERO M. **

RESUMEN

Se hace un análisis crítico de las pruebas de coagulación que miden la fase humoral, haciendo incapié en los errores de metodología y de interpretación, con las recomendaciones respectivas.

La enfermedad hemorrágica congénita o adquirida, representa un problema de importancia social siempre en crecimiento.

Dentro de las congénitas, sobresale el síndrome hemofílico por su frecuencia y por las alteraciones invalidantes que se pueden producir en las hemorragias no tratadas. Como es posible actualmente prevenir completamente estas manifestaciones por medio de plasma o sus derivados que contienen el factor deficiente, es absolutamente necesario hacer el diagnóstico preciso de la alteración. Las pruebas de laboratorio son simples, pero por lo general están mal hechas en la mayor parte de los laboratorios y además la interpretación de las mismas está muy lejos de ser lo ideal.

Otro problema es el diagnóstico de las coagulopatías adquiridas, que por lo demás son las más frecuentes e importantes, y se desarrollan con notable frecuencia como com-

plicación de otras enfermedades, creando problemas a especialistas de varias ramas de la medicina.

Hemos creído necesario hacer este análisis crítico de las diferentes pruebas de laboratorio con el objeto de ayudar al diagnóstico preciso de las enfermedades hemorrágicas.

Toma y manejo de la muestra

Si no se hace adecuadamente es la causa de los mayores errores que se presentan en la práctica diaria en todos los laboratorios. No se puede hacer la interpretación de un examen de laboratorio si no se tiene la completa seguridad de que la toma y manejo de la muestra se ha hecho en la forma más recomendable.

Los puntos siguientes representan los requisitos mínimos que al respecto deben seguirse con las muestras tomadas para un estudio de coagulación:

- a) La muestra debe tomarse con jeringa de plástico. No se recomiendan los tubos al vacío que se encuentran en el comercio, pues además de estimular la fase de contacto, en ocasiones no dan el volumen de sangre deseado y además producen espuma.
- b) Se debe evitar una estasis venosa prolongada al momento de tomar la muestra, pues se puede producir una fibrinólisis local que puede alterar la actividad de la coagulación.

* Laboratorio de Investigación Clínica, Hospital México.

** Servicio de Hematología, Hospital México.

- c) La punzada debe ser única para evitar la contaminación de la aguja con material tisular que contiene actividad trombo-plástica.
- d) La relación entre sangre y anticoagulante debe ser lo más exacta posible (una relación 9:1, sangre: anticoagulante) y debe recogerse la muestra en tubo de plástico o siliconizado. El vidrio activa —en ausencia de calcio—, el factor XII y el factor VII, lo que hace que se acorten los tiempos de la vía intrínseca y extrínseca respectivamente (14).
- e) La mezcla de la sangre y el anticoagulante debe hacerse suavemente para no formar espuma y además no producir hemólisis, pues estos son factores de activación de la fase de contacto.
- f) Se debe centrifugar la sangre lo antes posible, separar el plasma y colocarlo en tubos de plástico en un baño de hielo (19).
- g) Se debe trabajar la parte final de la coagulación a 37°C (19).
- h) Se deben seguir al pie de la letra las instrucciones del fabricante de los productos para el laboratorio de coagulación, pues su evasión es una de las mayores causas de error.
- i) El lavado de la cristalería es importante. Se deben remover perfectamente el detergente y la trombina. No se debe enjuagar la cristalería con etanol o acetona, pues esto fijará las proteínas a las paredes. Lo más recomendable es usar material desechable hasta donde sea posible.
- j) Se aconseja realizar las pruebas por el método manual y no hacerlo con los aparatos que existen para ello, ya que estos dan tiempos más cortos que el método manual y no reducen —como se piensa—, los errores interlaboratorio (2, 18).

Tiempo de protrombina

El tiempo de protrombina (TP), mide el complejo de factores de la fase extrínseca (VII, X, V, II).

Como tromboplastina se recomienda usar extracto de cerebro humano preparado en el propio laboratorio (2,3,10), pues da valores en segundos un poco más largos que los que dan las tromboplastinas comerciales (2,

19) —preparadas principalmente de cerebro de conejo—, y por lo tanto una mejor sensibilidad.

Una de las mayores causas de error que tiene esta prueba es el hecho de que la mayoría de los laboratorios usan las curvas prefabricadas que envían las casas comerciales con sus reactivos. Estas curvas no dan los resultados esperados y por lo tanto hay grandes errores en el reporte de los resultados (2). A esto se suma el hecho de que los valores en segundos que da el control 100% son muy bajos lo que hace la curva muy sensible. Por ejemplo, diferencias de 2 - 3 segundos con respecto al 100%, darán valores de un 70% o menos de actividad.

En algunos laboratorios se acostumbra usar el índice de actividad protrombínica, que se obtiene dividiendo el TP en segundos del paciente entre el TP del plasma de referencia. Con esto se obvia la necesidad de una curva de dilución y el uso de porcentajes.

Aunque el porcentaje de actividad ha probado ser reproducible y de valor estadístico, es recomendable el uso del índice de actividad protrombínica especialmente para el control de pacientes anticoagulados, teniendo la ventaja de que es posible obtener el índice de sensibilidad de cada tromboplastina usada comparándola con una de sensibilidad conocida (7) y lograr con esto resultados más reproducibles.

El tiempo de protrombina expresa la actividad global de los factores VII, V, X, II y I, además de algunos inhibidores, por lo que es llamado en forma más correcta "actividad del complejo protrombínico.

Tiempo de tromboplastina parcial

El tiempo de tromboplastina parcial (TTP), mide la fase intrínseca de la coagulación y es sensible a la concentración de todos los factores excluyendo el VII y el XIII.

El TTP puede ser definido como el tiempo de recalcificación del plasma en presencia de una tromboplastina lipóide parcial, al contrario de la tromboplastina completa del tiempo de protrombina (11). Con el fin de normalizar y obtener el máximo efecto de contacto se añade caolín, que además hace posible obtener resultados más reproducibles.

Es importante usar tromboplastinas que den tiempos de coagulación algo alargados con el control normal (38-45 segundos), pues son más sensibles a deficiencias leves de los factores de la coagulación. Se pueden obtener estos resultados aumentando la dilución de la tromboplastina parcial con tampón de Michaelis.

Un reactivo complementario para el TTP de gran utilidad en el laboratorio es el producto de contacto (PC), que no es otra cosa que factor XI activado. Se prepara activando los factores XII y XI con una sustancia llamada Celite 512 —que es una tierra de diatómeas—, capaz de absorber el factor XIa, el cual luego se eluye y se usa como reactivo (17).

La utilidad de este reactivo radica en el estudio de TTP prolongados. En esta condición y con un TP normal, el defecto hemostático estará en la fase intrínseca de la coagulación. Si el PC no corrige el TTP, la deficiencia debe localizarse en el factor VIII y/o IX; si corrige, la deficiencia está en la fase de contacto —factores XII y XI— (8). El paso a seguir es el TTP corregido con plasmas deficientes de los factores en sospecha.

Es importante recalcar que una deficiencia leve de algún factor no va a alterar los resultados de TTP o del TP, pues es bien sabido que valores de 30% para abajo de algún factor son los que van a alterar esas pruebas. Por eso se recomienda que cuando haya sospecha de deficiencia de un factor, se haga una dilución del plasma en estudio, con bófer 1:3 o con plasma deficiente en el factor que se sospecha 1:5 o 1:20. Montado simultáneamente con un normal, no debe dar una diferencia mayor de 6-8 segundos en relación con el normal.

La interpretación y los subsiguientes estudios deben hacerse con base en los resultados obtenidos en el TP y el TTP, pues los diferentes resultados nos van a dar un indicio de donde se encuentra el defecto, ya sea adquirido o congénito: un TP anormal con un TTP normal, nos hará sospechar una deficiencia de factor VII. Un TP normal con un TTP anormal nos indica una deficiencia de uno o más factores de la primera fase: XII, XI, VIII y IX. Un TP anormal con un TTP anormal nos indica una deficiencia de la segunda fase de la coagulación; o sea la fase común: factores X, V, II, I. La normalidad de ambas pruebas en un paciente

con diátesis hemorrágica, nos indicará una deficiencia de factor XIII o un problema cualitativo de plaquetas.

Tiempo de trombina

El tiempo de trombina (TT) mide el tiempo de coagulación del plasma citratado en presencia de trombina; sirve para explorar la última fase de la coagulación con excepción del factor XIII.

Un alargamiento del tiempo de trombina (normal de 18-25 seg) puede ser debido a una baja concentración de fibrinógeno, a un defecto cualitativo de la molécula de fibrinógeno (disfibrinogenemias) hereditarias o adquiridas, a la presencia de una anti-trombina, o de un inhibidor de la polimerización de los monómeros de fibrina (productos de degradación del fibrinógeno aumentados, terapia con heparina y antitrombina circulante).

Es importante montar siempre un control pues la trombina aún guardada a baja temperatura pierde potencia y por lo tanto puede dar valores alterados.

Cuantificación de fibrinógeno

Existen una gran cantidad de métodos para la cuantificación de fibrinógeno, encontrándose entre los más usados el basado en el tiempo de trombina.

Se basa este método en la cinética de transformación del fibrinógeno en fibrina. En estas condiciones, el tiempo de coagulación es proporcional a la concentración de fibrinógeno si se encuentra apropiadamente diluido.

El tiempo requerido en la fase proteolítica de transformación de fibrinógeno en monómeros de fibrina (1ª fase) es muy breve, por lo que se puede considerar como un mínimo constante. Como la velocidad de la fase de polimerización (2ª fase), depende de la concentración de monómeros de fibrina presentes, entre más grande sea la concentración de estos, más corto es el tiempo requerido para la formación del primer hilo de fibrina. Por lo tanto, el tiempo de coagulación de este sistema depende esencialmente de la fase de polimerización.

La condición óptima requerida en la cinética de la reacción se obtiene usando una

solución muy concentrada de trombina y diluyendo el plasma de manera de asegurar una concentración baja del sustrato.

Este es el método de cuantificación de fibrinógeno más recomendable, pues no es influenciado por la heparina, ni por la presencia de inhibidores de la polimerización—productos de degradación del fibrinógeno—, así como por la facilidad de preparación de reactivos, su ejecución y sensibilidad.

Además este método es particularmente útil para el descubrimiento de algunos fibrinógenos anormales, cuyo defecto consiste en un alargamiento de la polimerización.

Normotest y Thrombotest

La síntesis de cuatro de los nueve factores producidos en el hígado dependen de la presencia de vitamina K: II, VII, IX y X (12), llamados factores del complejo protrombínico o factores K dependientes.

Por lo tanto la insuficiencia hepática y la carencia de vitamina K son condiciones que conllevan la disminución de varios factores de la coagulación y como consecuencia una tendencia a la hemorragia (5).

La carencia de vitamina K, sea esta debida a mala absorción, colestasis o uso de anticoagulantes de tipo coumarínico lleva a una síntesis de moléculas alteradas o precursores de factores K dependientes que presentan la característica de no cumplir con su acción biológica, comportándose más bien como inhibidores o antagonistas de las pocas moléculas normales y por lo tanto incrementando la tendencia hemorrágica (5). Estos factores alterados en su estructura química son conocidos con el nombre de PIVKA (Protein Induced Vitamin K Antagonists o Absent).

No es de dudar pues que la coagulación ocupa dentro de la hepatología un campo importante dentro de los problemas clínicos.

En un plano eminentemente práctico, en hepatología las pruebas de coagulación son potencialmente útiles por lo menos por tres motivos: 1) Valoración de la cuantía del daño parenquimatoso; si no hay carencia o consumo de vitamina K, el nivel hematíco de los factores está en proporción con la función del parénquima, 2) Establecimiento del diagnóstico diferencial entre daño pa-

renquimatoso y carencia de vitamina K con base en la ausencia o presencia de PIVKA. 3) Valoración del riesgo hemorrágico de estos pacientes.

Para valorar el daño parenquimatoso, la prueba ideal debe ser de una sensibilidad tal que debe resultar alterada con reducciones mínimas de la síntesis de factores, o sea útil para valorar el estado de la síntesis protéica. No debiera ser sensible al déficit de vitamina K o a los inhibidores PIVKA a él asociados.

La prueba que reúne estas condiciones es el Normotest (NT), que es sensible a los factores II, VII y X e insensible a los inhibidores endógenos (15, 16).

Se trata el NT de una tromboplastina de cerebro de conejo, a la cual se le han añadido factores XIII, V, fibrinógeno y calcio (16).

Siendo sensible a los factores II, VII y X, da resultados anormales en los casos de deficiencia de vitamina K, pero no siendo sensible a los inhibidores y en particular al PIVKA, representa bien la síntesis protéica, pero subestima el déficit inducido por los inhibidores.

Esta prueba es más sensible dentro del ámbito de 30-70% de actividad, donde se exploran las hepatopatías. En el tiempo de protrombina este intervalo de actividad varía solo 10 segundos, pero en el NT se da una diferencia de 30 segundos, dando una mayor sensibilidad y reduciendo el error metodológico.

Para la valoración del riesgo hemorrágico es necesario adjuntar al NT una prueba que sea sensible a la acción de los inhibidores. Esta necesidad se pone de manifiesto no solo en la carencia de vitamina K, sino en otras hepatopatías como la hepatitis crónica agresiva y la amiloidosis hepática, que frecuentemente son acompañadas de inhibidores, o en el caso de la coagulación intravascular diseminada que puede acompañar algunas hepatopatías.

La prueba que reúne estas características es el Thrombotest (14), el cual contiene tromboplastina de buey—sensible a los inhibidores—, con factores XIII, V y fibrinógeno en cantidades óptimas y sensible a la deficiencia de factores II, VII y X.

Como originalmente fue concebido para la regulación de la terapia anticoagulante tiene una curva dosis/respuesta rápida y sensible en el ámbito de 5-30% de actividad.

El uso paralelo del NT y TT tiene una buena correspondencia, porque la única causa de discrepancia está representada por la presencia de inhibidores.

El paciente con carencia de vitamina K tiene una disminución neta de ambos valores, pero el valor del TT es constantemente más bajo y está mejor correlacionado con la tendencia hemorrágica, que es debida a la suma de reducción de factores más el efecto inhibidor del PIVKA (5).

Una insuficiencia hepática parenquimatosa nos dará un NT disminuido con un TT igualmente disminuido. La carencia de vitamina K nos dará un NT disminuido con un TT mucho más bajo, lo mismo sucede con la insuficiencia hepática parenquimatosa asociada a carencia de vitamina K. La presencia de inhibidores endógenos nos dará un NT normal con un TT bajo (5).

El NT y el TT son pruebas que exploran solo una fase de la hemostasia, pero debemos saber que el defecto hemostático en la hepatopatía crónica es un defecto múltiple, que comprende alteraciones cuantitativas y cualitativas de las plaquetas, y alteraciones de la fibrinólisis. Por lo tanto para valorar el riesgo hemorrágico es necesario usar otras pruebas para explorar las otras fases de la hemostasia (5).

Control de la terapia con heparina

La heparina se usa tanto en la profilaxis como en el tratamiento de las trombosis venosas profundas, detectadas por varios métodos (9).

Usada en dosis bajas la acción de la heparina se basa en su efecto potenciador de un inhibidor plasmático del factor Xa (4) —la antitrombina III—, factor clave dentro de los sistemas intrínseco y extrínseco, lo mismo que en la función plaquetaria (13).

La administración de heparina puede realizarse por vía venosa, subcutánea o intramuscular.

Por la vía subcutánea no se necesita control de los parámetros de la hemostasia, pues las complicaciones hemorrágicas descritas, principalmente postoperatorias, no han sido clínicamente significativas (6).

Cuando se usa la administración intravenosa, el control de la terapéutica puede realizarse por varios métodos: 1) tiempo de coagulación de la sangre total (Lee-White), 2) tiempo de coagulación del plasma recalcificado, 3) tiempo de tromboplastina parcial activado con caolín, 4) tiempo de trombina, y 5) concentración de heparina plasmática.

La prueba conveniente para el control del tratamiento debe tener: precisión reproducibilidad suficiente aún más allá de los límites de una terapéutica correcta y, considerando la posibilidad de tener que repetir las determinaciones con alguna frecuencia, la prueba debe poder realizarse en un tiempo corto (1).

El tiempo de trombina es una prueba rápida, reproducible y precisa, pero, puede tener el inconveniente de que la trombina en solución pierde actividad y es siempre necesario un plasma control y un ajuste de la actividad a un tiempo de coagulación deseado para poder comparar los valores en días diferentes. Además en condiciones en que pueden existir modificaciones del nivel de fibrinógeno —aparición de proteínas anormales o de productos de degradación del fibrinógeno—, puede determinar modificación de los valores del tiempo de trombina independientes de la concentración de heparina.

El tiempo de coagulación es el más usado para el control de la terapéutica con heparina, aunque el punto de coagulación final es algo incierto y el tiempo de determinación algo largo.

El tiempo de tromboplastina parcial activado con caolín tiene la ventaja de poder ser realizado en pocos minutos, además de que su reproducibilidad, dentro de los límites terapéuticos, es mayor que la del tiempo de coagulación. Para valores normales entre 35 y 45 segundos, los valores terapéuticos oscilan entre 60 y 100 segundos (20).

El control de la terapéutica varía según el tipo de administración utilizado, intermitente o continua. En el primer caso debe

realizarse un control a las 3, 4 y 5 horas de la inyección. Esto con el objeto de determinar el ritmo con que se debe mantener la administración de la heparina en las dosis elegidas. Los controles posteriores

pueden realizarse cada 24 horas. En el caso de infusión continua, el primer control debe realizarse a las 2 horas y se ajusta el goteo de acuerdo a los resultados. Los controles posteriores se hacen cada 24 horas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ALTMAN, R., ROUVIER, J.:
Utilización de las pruebas de la hemostasia para el control de la terapia antitrombótica. *In* Técnicas de Hemostasia y Trombosis (ed. M. Pavlovsky), Ibáñez Ed. Buenos Aires. 1975.
- 2.—BARRANTES, A., FONSECA, J.:
Estudio comparativo de varias tromboplastinas con la BCT (British Comparative Thromboplastin. En preparación.
- 3.—BIGGS, R., MACFARLANE, R. G.:
Human Blood Coagulation and its Disorders. 3rd. ed. Blackwell Scientific Pub. Oxford, 1962.
- 4.—BIGGS, R., DENSON, K. W. E., AKMAN, N., BORRET, R., HADDEN, M.:
Antithrombin III, Antifactor Xa and Heparin. *Brit. J. Haemat.* 19: 283, 1970.
- 5.—DIOGUARDI, N.:
I test di coagulazione nelle malattie epatiche. *In* Aterazioni congenite ed acquisite della coagulazione. Metodi di studio (ed. P.M. Mannucci, S. Gorini) Piccin Editore, Padova, 1974.
- 6.—EDITORIAL:
Subcutaneous heparin, *Lancet.* 11:502, 1974.
- 7.—DENSON, K.W.E., BIGGS, R.:
Laboratory Diagnosis, Test of Clotting Function and Their Standardization. *In* Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis (ed. Rosemary Biggs), 2º Ed. Blackwell, 1976.
- 8.—INGRAM, G.I.C.:
Simple screening test for the diagnosis of isolated clotting factor defects, with special reference to contact factor defects. *J. Clin. Path.* 28:524, 1975.
- 9.—KAKKAR, V.V.:
Subcutaneous heparin. *Lancet.* ii:784, 1974.
- 10.—KORSAN-BENGTSEN, K., JOHSEN, M., PEHRSON, N. G.:
Comparison between British Comparative Thromboplastin (BCT) and a factor II-VII-X determination method (Simplastin A) based on fresh plasma samples from dicoumarol-treated patients. *Thrombos. Haemostas.* - (Sttug). 37:98, 1977.
- 11.—NYE, S.W., GRAHAM, J.B., BRINKHOU, K. M.:
The partial thromboplastin time as a screening test for the detection of latent bleeders. *Am. J. Med. Sci.* 243: 279, 1962.
- 12.—MANNUCCI, P. M., PARETI, F. I., DiSANTO, CAMILLA:
Value of coagulation tests in liver disease. *Farmakoterapi.* 28:38, 1974.
- 13.—O'BRIEN, J. R., ETHERINGTON, M., JAMIESON, S., KABER, M. R.:
Platelet function in venous thrombosis and low-dosage heparin. *Lancet.* 1:1302, 1972.
- 14.—OWREN, P. A.:
The interrelation ship between Normotest and Thrombotest. *Farmakoterapi.* 25:1, 1969.
- 15.—OWREN P.A.:
Normotest in liver disease. *Farmakoterapi.* 25:46, 1969.
- 16.—OWREN, P.A., STRANDLI, O.K.:
Normotest. *Farmakoterpi.* 1-2:14, 1969.
- 17.—PÉREZ-REQUEJO, J.L., INGRAM, G.I.C.:
Preparation of contact product as a reagent for coagulation tests. *J. Clin. Path.* 28:596, 1975.
- 18.—POLLER, L., THOMSON, JEAN, M., YEE, K.F.:
Automated versus manual techniques for the prothrombin time test: results of proficiency assessment studies. En prensa.
- 19.—RUGGERI, Z. M., CAPITANIO, A.:
I tests di laboratorio per lo studio delle anomalie congenite e acquisite delle coagulazione. *In* Aterazione congenite ed acquisite della coagulazione. Metodi di studio (ed. P.M. Mannucci, S. Gorini) Piccin Editore, Padova, 1974.
- 20.—SPECTOR, I. M.:
Control of heparin therapy with activated parcial thromboplastin time. *J.A.M.A.* 201: 157, 1967.